



101201472  
PCT/EP 03/02538  
Rec'd PCT/PIO  
C.E. - 1-4-7  
10 SEP 2004

REC'D 19 MAY 2003  
WFO PCT

# Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

PD2002 A 000064

EPO - DG 1

25. 04. 2003

93

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



na, il 21 MAR 2003

IL DIRIGENTE

Dr. Marcus Giorgio Conte

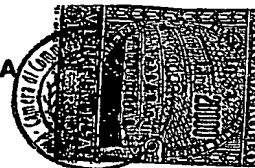
BEST AVAILABLE COPY

# AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.r.l. SR  
Residenza ABANO TERME (PD) codice 01510440744  
2) Denominazione \_\_\_\_\_  
Residenza \_\_\_\_\_ codice \_\_\_\_\_

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome e nome \_\_\_\_\_ cod. fiscale \_\_\_\_\_  
denominazione studio di appartenenza \_\_\_\_\_  
via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_ cap \_\_\_\_\_ (prov) \_\_\_\_\_

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.r.l.  
via Ponte della Fabbrica n. 3/B città ABANO TERME cap 35031 (prov) PD

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) \_\_\_\_\_ gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

"Derivati esterei dell'acido ialuronico per la preparazione di idrogel da utilizzare in campo biomedico, sanitario e chirurgico e come sistemi di rilascio controllato di farmaci". ---

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA \_\_\_\_\_ N° PROTOCOLLO \_\_\_\_\_

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) BELLINI Davide 3) \_\_\_\_\_  
2) ZANELATO Annamaria 4) \_\_\_\_\_

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione \_\_\_\_\_ tipo di priorità \_\_\_\_\_ numero di domanda \_\_\_\_\_ data di deposito \_\_\_\_\_ allegato S/R \_\_\_\_\_  
1) \_\_\_\_\_  
2) \_\_\_\_\_

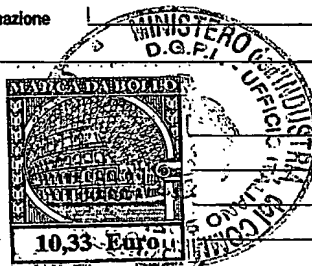
## SCIoglimento RISERVE

Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Nessuna. ---



## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N: es.

Doc. 1) 2 PROV n. pag. 28 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) ....  
Doc. 2) 2 PROV n. tav. 02 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) .....  
Doc. 3) 0 RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale .....  
Doc. 4) 0 RIS designazione inventore .....  
Doc. 5) 0 RIS documenti di priorità con traduzione in italiano .....  
Doc. 6) 0 RIS autorizzazione o atto di cessione .....  
Doc. 7) 0 nominativo completo del richiedente

## SCIoglimento RISERVE

Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_

confronta singole priorità

8) attestati di versamento, totale Euro Duecentonovantuno/80. ---

obbligatorio

COMPILATO IL 04/03/2002

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S.r.l.

CONTINUA SINO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO SI

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA DI PADOVA codice 28

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

PD 2002 A 000064

Reg. A

L'anno: DUEMILADUE, il giorno DODICI, del mese di MARZO

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

NESSUNA

IL DEPOSITANTE

Daniela Frances



L'UFFICIALE ROGANTE

Lucio Sini

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E INVENZIONE

NUMERO DOMANDA PD 2002 A 000064 REG. A

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO 12/03/2002  
DATA DI RILASCIO 12/03/2002

**D. TITOLO**

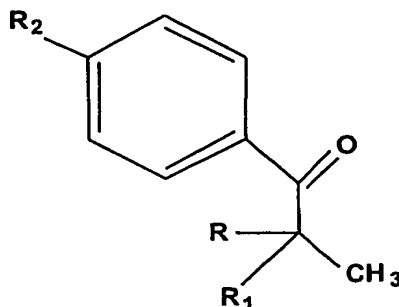
0. TITOLO  
"Derivati esterei dell'acido ialuronico per la preparazione di  
idrogel da utilizzare in campo biomedico, sanitario e chirurgico e  
come sistemi di rilascio controllato di farmaci".---

## L. RIASSUNTO

La presente invenzione descrive la preparazione di idrogel tramite irradiazioni ultraviolette, a partire da molecole di acido ialuronico (e/o suoi derivati chimici) esterificate con fotoiniziatori del gruppo formato dai derivati del propiofenone, in grado di reticolare pur non presentando insaturazioni del tipo  $C=C$  all'interno della molecola. Gli idrogel così sintetizzati possono essere vantaggiosamente impiegati in campo biomedico, chirurgico e come sistemi di rilascio controllato di farmaci in quanto dotati di particolari proprietà meccaniche e viscoelastiche.



## M. DISEGNO



**dove :**

$$R, R_1 = OH, CH_3, C_2H_5, CH_3-(CH_2)_n-OH$$
$$R_2 = \text{OH}, \text{CH}_3\text{O}, \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{O}, \text{HO-(CH}_2)_n\text{-CH}_2\text{O}$$

PD 2002 A000064

Descrizione di una invenzione industriale dal titolo "Derivati esterei dell'acido ialuronico per la preparazione di idrogel da utilizzare in campo biomedico, sanitario e chirurgico e come sistemi di rilascio controllato di farmaci" della Fidia Advanced Biopolymers S.r.l. con sede in Via Ponte della Fabbrica, 3/B - 35031 Abano Terme (PD), nella persona del suo Presidente Dr. Emilio Mauri.

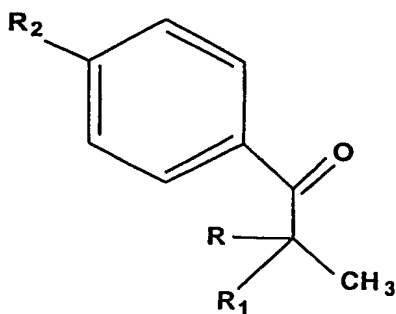
Inventori designati: Davide Bellini

Anna Zanellato

Depositata il 12.3.2002 con n° .....

#### OGGETTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive la preparazione di idrogel tramite irradiazioni ultraviolette, a partire da molecole di acido ialuronico (e/o suoi derivati chimici) esterificate con fotoiniziatori del gruppo formato dai derivati del propiofenone, in grado di reticolare pur non presentando insaturazioni del tipo c-c all'interno della molecola. Gli idrogel così sintetizzati possono essere vantaggiosamente impiegati in campo biomedico, chirurgico e come sistemi di rilascio controllato di farmaci in quanto dotati di particolari proprietà meccaniche e viscoelastiche.



dove :

$R, R_1 = OH, CH_3, C_2H_5, CH_3-(CH_2)_n-OH$

$R_2 = OH, CH_3O, CH_3-CH_2O, HO-(CH_2)_n-CH_2O$





### CAMPO DELL'INVENZIONE

Risulta noto l'uso di gel e idrogel di nuova generazione preparati a partire da polimeri sintetici, come ad esempio il poli-idrossietilmetacrilato (PHEMA), (Holly, F.J. et al., J. Biomed. Mater. Res. 1975, 9: 315), o da derivati semisintetici di polisaccaridi naturali, come ad esempio il derivato di acido ialuronico reticolato con vinil-sulfone (Balazs, E.A. et al., Blood Coagulation and Fibrinolysis, 1991, 2: 173-178), nelle antiadesioni, nel rilascio di farmaci o di proteine biologicamente attive e nei processi di riparazione tissutale.

E' altresì nota la possibilità di ottenere idrogel attraverso radiazioni ultraviolette sia da polimeri sintetici (Amarpreet S. Sawhney et al., Macromolecules, 1993, 26:581-587) sia da derivati semisintetici, come gli idrogel di macromeri cross-linkati e polimerizzati (brevetto US n. 5,410,016), o preparare gel da polimeri naturali come, ad esempio, l'acido ialuronico (brevetto US n. 6,031,017) o da diversi glicosamminoglicani (brevetto europeo n. 0554898), utilizzati anch'essi nelle ampie adesioni e in numerose applicazioni biomediche come rilascio di farmaci.

Risulta, inoltre, nota la possibilità di preparare gel per l'incapsulazione di materiale biologico partendo da biopolimeri idrosolubili contenenti almeno due siti di insaturazione, polimerizzati da fotoiniziatori attivati da radiazioni con lunghezza d'onda tra i 320-900 nm, (brevetto US n. 6,258,870).

La fotoincapsulazione di cellule come i condrociti può essere utilizzata per la produzione di cartilagine ingegnerizzata (Bryant et





al., Biomed Sci Instrum 1999, 35:309-314), mentre il fotocross-linking di polimeri con il propilen-fumarato, può portare alla formazione di matrici tridimensionali utilizzabili per la ricostruzione del tessuto osseo (Fisher JP. et al., J Biomater Sci Polymer Ed 2001, 12(6):673-687).

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione descrive la preparazione di idrogel tramite irradiazione ultravioletta, a partire da molecole di acido ialuronico e/o da suoi derivati chimici come, ad esempio, gli HYAFF® (esteri dell'acido ialuronico, brevetto europeo n. 0216453 B1) e/o gli HYADD™ (ammidi dell'acido ialuronico, domanda di brevetto europeo n. 1095064), esterificate con fotoiniziatori del gruppo formato dai derivati del propiofenone, in grado di reticolare pur non presentando insaturazioni del tipo c-c all'interno della molecola.

Da alcuni anni è noto l'utilizzo di idrogel in chirurgia, campo in cui vengono impiegati sia polimeri non riassorbibili, come i poliesteri e le poliammidi, che polimeri biodegradabili, come quelli a base di collagene, acido glicolico, acido lattico, (Holland SJ. Et al., J Controlled Release, 1986,4:155-180) ed acido ialuronico.

Il nuovo idrogel a base di acido ialuronico, oggetto della presente invenzione, si distingue da tutti i gel noti a base di acido ialuronico o contenenti altri polimeri assieme all'acido ialuronico, per la metodologia di sintesi e di preparazione del gel stesso: infatti, il gel descritto è ottenuto da trattamento con radiazioni aventi lunghezza d'onda da 280 a 750 nm ed, in particolare, con luce ultravioletta a





336 nm (UV), pur non presentando insaturazioni nella molecola (fino a questo momento, infatti, la presenza di insaturazioni nella molecola da reticolare era ritenuta condizione indispensabile per l'innesco della reazione di polimerizzazione iniziata dal fotoiniziatore unito chimicamente o semplicemente mescolato al polimero da gelificare).

L'acido ialuronico utilizzabile nella presente invenzione può derivare da qualsiasi fonte, ad esempio per estrazione da creste di gallo (brevetto europeo n. 0138572), per via fermentativa (domanda di brevetto europeo n. 0716688), o per via biotecnologica (brevetto italiano n. PD94A000042) ed avere un peso molecolare compreso tra i 400 e 3.000.000 Da., in particolare tra 150.000 e 1.000.000 Da.

I derivati dell'acido ialuronico che possono essere utilizzati nella preparazione degli idrogel oggetto della presente invenzione, sono i seguenti:

- 1) HYAFF®: esteri dell'acido ialuronico con alcoli della serie alifatica, aralifatica, cicloalifatica, aromatica, ciclica ed eterociclica (purchè non presenti doppi legami c=c nelle suddette molecole), con una percentuale di esterificazione che può variare a seconda del tipo e della lunghezza dell'alcool usato, comunque mai superiore al 75% di esterificazione poiché il polimero deve essere sempre idrosolubile, mentre la restante percentuale di acido ialuronico non esterificata deve essere salificata solo con sali d'ammonio quaternari per permettere una seconda esterificazione con i fotoiniziatori successivamente descritti (brevetto europeo n. 0216453 B1);



10  
FARMACIA S. ANTONIO S. R. L.  
FARMACIA S. ANTONIO  
*[Signature]*

- 2) HYADD<sup>TM</sup>: ammidi dell'acido ialuronico con ammine della serie alifatica, aralifatica, cicloalifatica, aromatica, ciclica ed eterociclica, (purchè non presenti doppi legami c=c nelle suddette molecole) con una percentuale di amidazione non superiore al 50% poiché il polimero deve essere sempre idrosolubile, mentre la restante percentuale di acido ialuronico non sottoposta ad amidazione deve essere salificata solo con sali d'ammonio quaternari per permettere una seconda esterificazione con i fotoiniziatori successivamente descritti (domanda di brevetto europea n. 1095064);
- 3) derivati O-solfatati (brevetto europeo n. 0702699 B1) e derivati N-solfatati dell'acido ialuronico (domanda di brevetto europeo n. 0971961);
- 4) ACP<sup>®</sup>: esteri interni dell'acido ialuronico con una percentuale di esterificazione mai superiore al 20% poiché il polimero deve essere sempre idrosolubile, mentre la restante percentuale di acido ialuronico non esterificata deve essere salificata solo con sali d'ammonio quaternari per permettere una seconda esterificazione con i fotoiniziatori successivamente descritti (brevetto europeo n. 0341745 B1).

Le suddette molecole di acido ialuronico e/o i suoi derivati vengono inizialmente esterificate con bromuro di 2-idrossi-4-(2-idrossietossi)-2-metilpropiofenone, la cui reazione di bromurazione è descritta in Lewis et Boozer, Am. Chem. Soc., 1952, 74, 308.

Il fotoiniziatore utilizzato deve essere un derivato del propiofenone e, in particolare, un derivato avente almeno una funzione ossidrilica





*Mpur*

primaria e/o secondaria libera come, ad esempio, il 4-(2,3-diidrossipropossi)-3-metossipropiofenone (ossidrile primario) o il 4-(2-idrossi-3-morfolino)propossi-propiofenone (ossidrile secondario), (Register of Toxic Effect of Chemical Substance, 1985-86).

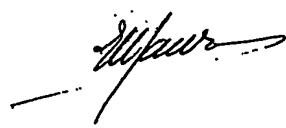
Il processo di esterificazione tra l'acido ialuronico e/o il suo derivato e il bromuro del propiofenone può avvenire fino ad una percentuale massima del 75% (purchè il polimero finale risulti sempre idrosolubile), con la conseguente formazione di un nuovo estere dell'acido ialuronico, qui di seguito denominato con la sigla *HYBA 120*.

Il prodotto così esterificato viene quindi irradiato, preferibilmente con luce UV a 336 nm per un tempo variabile da 2 a 30 minuti, a seconda della percentuale di esterificazione, della concentrazione in acqua del polimero e del grado di polimerizzazione desiderato.

Gli idrogel così ottenuti sono caratterizzati dalle seguenti specifiche:

- a) l'assenza di insaturazioni nel polimero che reticola (nel modo sopra descritto) senza l'aggiunta di alcuna componente funzionante come catalizzatore della reazione di polimerizzazione;
- b) la sterilità: l'ottenimento di un gel sterile è possibile in quanto il derivato estereo dell'acido ialuronico viene previamente sterilizzato a vapore;
- c) ottime proprietà viscoelastiche: il prodotto è caratterizzato da una parziale esterificazione con un fotoiniziatore rappresentato da un derivato del propiofenone ed, inoltre, da una parziale





salificazione con sali d'ammonio quaternari o con metalli alcalini o alcalino-terrosi. Questi idrogel hanno una struttura chimico-fisica completamente diversa dai gel noti costituiti da esteri interni o esterni dell'acido ialuronico. Infatti, i gel costituiti da esteri interni dell'acido ialuronico sono formati da micro-particelle di polimero reticolato unite tra loro da semplici legami di natura fisica. Gli esteri esterni, invece, possono esistere in forma di gel grazie ad una semplice idratazione, che dipende dalla loro percentuale di esterificazione e dalla loro concentrazione in acqua. Al contrario, i nuovi composti qui descritti presentano una struttura tridimensionale compatta del tipo parete-parete. Sono pertanto caratterizzati da una maggiore resistenza meccanica (prestandosi dunque ad essere vantaggiosamente impiegati in svariati settori della medicina e della chirurgia) e da proprietà viscoelastiche che variano a seconda del tempo di esposizione ai raggi UV. L'intervallo di tempo utile è tra i 2 e i 30 minuti ed, in particolare, tra i 3 e i 15 minuti. In generale, è stato riscontrato che, aumentando la concentrazione del derivato estereo dell'acido ialuronico, è possibile ottenere la formazione di gel a tempi di radiazione UV più bassi. Il tipo di soluzione acquosa usato per l'ottenimento dell'idrogel influisce sulle proprietà viscoelastiche di questi materiali, data la loro appartenenza al gruppo dei polielettroliti: possono essere utilizzati acqua bidistillata,





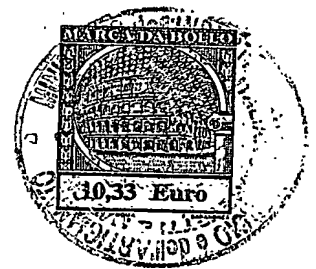
tamponi o soluzioni fisiologiche come, ad esempio, il tampone fosfato o la soluzione salina.

Riassumendo, gli idrogel oggetto della presente invenzione, possono essere ottenuti considerando i seguenti parametri:

- I. il peso molecolare dell'acido ialuronico di partenza;
- II. la percentuale di esterificazione dell'acido ialuronico o del suo derivato con il fotoiniziatore bromurato;
- III. per il derivato estereo dell'acido ialuronico, il tipo di alcool legato ai suoi gruppi carbossilici e la percentuale di esterificazione;
- IV. per il derivato ammidico dell'acido ialuronico, il tipo di ammina legata all'acido ialuronico e la percentuale di amidazione;
- V. la concentrazione del materiale di partenza usato per l'ottenimento del gel: l'intervallo di concentrazione utile va dallo 0.01 al 100% (p/p) e in particolare dallo 0.1 al 50% (p/p);
- VI. il tempo di esposizione alla radiazione scelta;
- VII. il tipo di soluzione nella quale il gel viene preparato.

I gel così sintetizzati, essendo derivati a matrice polisaccaridica, possono trovare vaste applicazioni (anche come biomateriali) in campo biomedico-chirurgico, sanitario e farmaceutico.

Ad esempio, in forma di pellicole, membrane e garze, essi possono trovare applicazione in dermatologia per favorire i processi di cicatrizzazione, in chirurgia interna per impedire l'adesione delle superfici tissutali, come rivestimenti polimerici di organi e vasi sanguigni.



L'iniezione intraarticolare di *HYBA 120* (non reticolato), con successiva sua polimerizzazione tramite sonda a radiazioni UV introdotta con tecniche artroscopiche nel ginocchio permette, invece la formazione di un idrogel costituito da acido ialuronico (e/o un suo derivato) direttamente nella cavità sinoviale. Il suddetto gel può contenere, eventualmente, un farmaco (come un anti-infiammatorio, e/o un inibitore delle metallo-proteasi, e/o un inibitore della NO sintasi, o altre molecole biologicamente attive utili alla cura della patologia artrosica e/o artritica), per un suo lento rilascio, associato all'azione principalmente meccanica di visco-supplementazione offerta dal gel. Inoltre, l'acido ialuronico in forma di idrogel presenta tempi di degradazione chimica più lunghi rispetto a quelli di un visco-supplementante iniettato in forma fluida: infatti, test *in vitro* effettuati per stabilire i tempi di degradazione dell'idrogel senza farmaci inclusi, hanno evidenziato come a 37°C il suddetto idrogel mantenga





completamente intatta la sua struttura tridimensionale anche dopo 4 settimane.

La letteratura scientifica mondiale riporta di sperimentazioni fatte con gel a base di polimeri sintetici biocompatibili ma non biodegradabili (Malmonge et al., Braz J Med Biol Res, 2000, 33(3):307-312) impiantati nelle articolazioni danneggiate come "cartilagine artificiale" tramite operazione chirurgica.

L'idrogel oggetto della presente invenzione si differenzia sostanzialmente dai polimeri noti, e dal suddetto tipo di impianto perché, oltre ad essere costituito da acido ialuronico, noto per essere un polimero naturale altamente biodegradabile che libera solamente oligosaccaridi non tossici, per la sua applicazione non vi è necessità di una operazione di artrotomia, in quanto il gel viene iniettato in forma fluida e reticolato in artroscopia tramite luce UV.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione riguarda l'impiego dei suddetti idrogel nei processi di rivestimento di dispositivi, sia in campo medico sia in altri settori dell'industria, in quanto capaci di fornire nuove caratteristiche biologiche alle superfici dei materiali impiegati come supporto. Il bio-rivestimento costituito dall'idrogel può inoltre contenere principi attivi quali farmaci, proteine e fattori di crescita rilasciabili dalla matrice polisaccaridica durante l'applicazione.

I dispositivi che possono essere rivestiti sono, ad esempio, cateteri, tubicini, valvole cardiache, stent vascolari, protesi di tessuto molle, protesi di origine animale quali valvole cardiache porcine, tendini





artificiali, lenti a contatto e lenti intraoculari, ossigenatori di sangue, organi artificiali quali reni, cuore, fegato e pancreas, sacche per sangue, strumenti chirurgici, sistemi di filtrazione, strumenti di laboratorio.

Il processo di rivestimento della superficie di tali dispositivi può avvenire, ad esempio, mediante la tecnica del Plasma Coating descritta nella domanda di brevetto internazionale della richiedente, Pubblicazione No. WO96/24392.

Di assoluta novità risulta essere, inoltre, la modalità di somministrazione intra-midollare (successivamente descritta) per un rilascio controllato e continuo di farmaci e/o di fattori di crescita neuronale e/o di anticorpi, atti a favorire la rigenerazione neuritica dei neuroni midollari danneggiati soprattutto in seguito a lesioni traumatiche.

E' infatti noto che alcune proteine, come IGF-I, il GDNF ed altre neurotrofine, possono proteggere i motoneuroni da morte quando applicati direttamente nel sito di lesione midollare per infusione continua ma con una finestra di tempo per la somministrazione molto ristretta (Bilak MM. Et al., Neuroreport 2001, 8, 12(11): 2531-35). E' inoltre noto che l'acido ialuronico è presente nel midollo spinale distribuito sia nella materia bianca, dove circonda la mielina neuritica, che attorno ai corpi cellulari dei neuroni (Bignami A. et al., Exp Neurol 1992, 117 (1): 90-93).

Viene dunque di seguito descritto, quale ulteriore oggetto della presente invenzione, l'uso dell'idrogel come nuovo sistema di



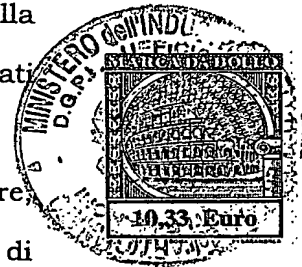


somministrazione "in situ", cioè direttamente nella zona midollare traumatizzata, dei farmaci sopra citati mescolati allo HYBA 120, il quale verrà prima iniettato e successivamente fotopolimerizzato direttamente nel midollo. In questo modo si potrà ottenere un rilascio lento, continuo e controllato di sostanze biologicamente e farmacologicamente attive, senza introdurre nel midollo alcun prodotto estraneo e/o tossico poiché, come sopra menzionato, l'acido ialuronico risulta essere un componente della sostanza midollare.

Questo nuovo tipo di somministrazione intramidollare non è mai stato precedentemente descritto, poiché tutti i farmaci usati nella terapia del midollo traumatizzato vengono sempre somministrati tramite infusione continua e diretta nel sito di lesione.

Gli idrogel oggetto della presente invenzione, possono, inoltre, costituire anche una valida matrice di supporto per la crescita di numerose tipologie di cellule umane o animali, sia differenziate (come ad esempio, cheratinociti, fibroblasti, osteociti, adipociti, condrociti), che indifferenziate, come le cellule mesenchimali staminali del midollo osseo.

Esempi successivamente descritti dimostrano come le radiazioni UV non alterino il cariotipo delle cellule inglobate nell'estere dell'acido ialuronico HYBA 120 (che viene polimerizzato), e come la vitalità cellulare e le specifiche morfologiche delle suddette cellule risultino inalterate. Per questo motivo è possibile preparare *in vitro*, e successivamente applicare *in vivo*, diversi tipi di "tessuti artificiali" soprattutto di origine connettivale, costituiti dalle cellule inglobate nel



Il costrutto così preparato (gel + cellule) può essere iniettato intra-articolarmente e successivamente reticolato tramite luce UV ottenuta per introduzione artroscopica direttamente nella cavità sinoviale di un'apposita sorgente di radiazione. Con questo nuovo tipo di cartilagine ingegnerizzata è possibile, dunque, riparare una cartilagine lesionata per via artroscopica: infatti, non è mai stato in precedenza descritto l'uso di gel contenenti cellule, fotopolimerizzati direttamente nelle articolazioni. La letteratura scientifica mondiale riporta al riguardo solo sperimentazioni effettuate con condrociti inglobati in gel di collagene-fibrina (Perka et al., Clin Exp Rheumatol, 2000, 18(1): 13-22), o contenuti in matrici di alginato (Paige KT et al., Plast Reconstr Surg, 1996, 97(1): 179-180) o cresciuti in gel di agarosio, applicati tramite operazione chirurgica sulla cartilagine





6,21 gr del sale di tetrabutyl ammonio di acido ialuronico con un peso molecolare di 180000 Da. (10 meq) vengono solubilizzati in 248 ml di



dimetilsolfossido (DMSO) a temperatura ambiente. A questa soluzione si aggiungono 2 gr di HHMP bromuro (7 meq) e la soluzione viene mantenuta a 37°C per 48 ore. Una soluzione al 2,5% (p/p) di NaCl in acqua viene quindi aggiunta e la miscela risultante viene versata in 750 ml di acetone sotto agitazione. Si forma un precipitato che viene filtrato e lavato tre volte in 100 ml di acetone/acqua 5:1, tre volte con 100 ml di acetone e infine seccato sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 5,3 grammi del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa del contenuto di HHMP viene condotta mediante HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione) previa idrolisi alcalina. Il contenuto totale di gruppi esterei viene condotto in accordo con il metodo di saponificazione descritto alle pagg. 169-172 di "Quantitative organic analysis via functional group" quarta edizione John Wiley and Sons Publication.

#### Esempio 2

*Preparazione di un derivato di acido ialuronico avente il 50% delle funzioni carbossiliche esterificate con il 2-idrossi-4-(2-idrossietossi)-2-metilpropiofenone (HHMP) e il rimanente 50% delle funzioni carbossiliche salificate con sodio.*

6,21 gr del sale di tetrabutyl ammonio di acido ialuronico con un peso molecolare di 180000 Da. (10 meq) vengono solubilizzati in 248 ml di DMSO a temperatura ambiente. A questa soluzione si aggiungono 1,4 gr di HHMP bromuro (5 meq) e la soluzione viene mantenuta a 37°C per 36 ore. Una soluzione al 2,5% (p/p) di NaCl in acqua è quindi aggiunta e la miscela risultante viene versata in 750 ml di acetone





sotto agitazione. Si forma un precipitato che viene filtrato e lavato tre volte in 100 ml di acetone/acqua 5:1, tre volte con 100 ml di acetone e infine seccato sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 4,9 grammi del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa del contenuto di HHMP viene condotta mediante HPLC previa idrolisi alcalina. Il contenuto totale di gruppi esterei viene condotto in accordo con il metodo di saponificazione descritto alle pagg. 169-172 di "Quantitative organic analysis via functional group" quarta edizione John Wiley and Sons Publication.

### Esempio 3

*Preparazione di un derivato di acido ialuronico avente il 25% delle funzioni carbossiliche esterificate con il 2-idrossi-4-(2-idrossietossi)-2-metilpropiofenone (HHMP) e il rimanente 75% delle funzioni carbossiliche salificate con sodio.*



6,21 gr del sale di tetrabutyl ammonio di acido ialuronico con un peso molecolare di 180000 Da. (10 meq) vengono solubilizzati in 248. ml di DMSO a temperatura ambiente. A questa soluzione si aggiungono gr 0,72 di HHMP bromuro (2.5 meq) e la soluzione viene mantenuta a 37°C per 24 ore. Una soluzione al 2,5% (p/p) di NaCl in acqua è quindi aggiunta e la miscela risultante viene versata in 750 ml di acetone sotto agitazione. Si forma un precipitato che viene filtrato e lavato tre volte in 100 ml di acetone/acqua 5:1, tre volte con 100 ml di acetone e infine seccato sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 4,4 grammi del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa del contenuto di HHMP viene condotta mediante HPLC





previa idrolisi alcalina. Il contenuto totale di gruppi esterei viene condotto in accordo con il metodo di saponificazione descritto alle pagg. 169-172 di "Quantitative organic analysis via functional group" quarta edizione John Wiley and Sons Publication.

#### Esempio 4

*Preparazione di un derivato di acido ialuronico avente il 25% delle funzioni carbossiliche esterificate con il 2-idrossi-4-(2-idrossietossi)-2-metilpropiofenone (HHMP), il 25% delle funzioni carbossiliche esterificate con alcool benzilico e il rimanente 50% delle funzioni carbossiliche salificate con sodio.*

6,21 gr del sale di tetrabutyl ammonio di acido ialuronico con un peso molecolare di 180000 Da. (10 meq) vengono solubilizzati in 248 ml di DMSO a temperatura ambiente. A questa soluzione si aggiungono gr 0,72 di HHMP bromuro (2.5 meq) e la soluzione è mantenuta a 37°C per 24 ore. La soluzione viene nuovamente portata a temperatura ambiente ed addizionata con 0,29 ml di benzil bromuro (2.5 meq.). Si riporta la soluzione a 37°C per altre 36 ore. Una soluzione al 2,5% (p/p) di NaCl in acqua viene quindi aggiunta e la miscela risultante è versata in 750 ml di acetone sotto agitazione. Si forma un precipitato che viene filtrato e lavato tre volte in 100 ml di acetone/acqua 5:1, tre volte con 100 ml di acetone e infine seccato sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 4,6 grammi del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa del contenuto di HHMP e alcool benzilico viene condotta mediante HPLC previa idrolisi alcalina. Il contenuto totale di gruppi esterei viene condotto in accordo con il metodo di





saponificazione descritto alle pagg. 169-172 di "Quantitative organic analysis via functional group" quarta edizione John Wiley and Sons Publication.

#### Esempio 5

*Preparazione di un derivato di acido ialuronico avente il 15% delle funzioni carbossiliche amidate con dodecil ammina, il 25% delle funzioni carbossiliche esterificate con HHMP e il rimanente 60% delle funzioni carbossiliche salificate con sodio.*

6,21 gr del sale di tetrabutyl ammonio di acido ialuronico con un peso molecolare di 180000 Da. (10 meq) vengono solubilizzati in 248 ml di DMSO a temperatura ambiente. A questa soluzione si aggiungono 0,6 ml (9 meq) di acido metansolfonico al 99%, e successivamente si aggiungono 0,240 gr (1.5 meq) di 1,1' carbonildiimidazolo (CDI). Si lascia reagire a temperatura ambiente per 60-90 minuti. Si porta la temperatura a 37°C e si aggiungono 0,465 gr (2.5 meq) di dodecil ammina, si lascia quindi reagire per 24 ore a 37°C. Si riporta la soluzione a temperatura ambiente e si aggiungono gr 0,72 di HHMP bromuro (2.5 meq), poi la soluzione viene nuovamente portata 37°C per 24 ore. Una soluzione al 2,5% (p/p) di NaCl in acqua viene quindi aggiunta e la miscela risultante viene versata in 750 ml di acetone sotto agitazione. Si forma un precipitato che viene filtrato e lavato tre volte in 100 ml di acetone/acqua 5:1, tre volte con 100 ml di acetone e infine seccato sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono così 4,5 grammi del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa del contenuto di HHMP e dodecil ammina viene condotta mediante





HPLC previa idrolisi alcalina. Il contenuto totale di gruppi esterei viene condotto in accordo con il metodo di saponificazione descritto alle pagg. 169-172 di "Quantitative organic analysis via functional group" quarta edizione John Wiley and Sons Publication.

#### Esempio 6

*Preparazione di un estere dell'acido ialuronico avente il 50% delle funzioni carbossiliche esterificate con HHMP e il rimanente 50% delle funzioni carbossiliche salificate con sodio, a partire da un acido ialuronico solfatato con grado di solfatazione 3.*

1 gr di sale di tetrabutyl ammonio dell'acido ialuronico viene solubilizzato in 40 ml di DMSO. A questa soluzione si aggiungono 5.22 gr di un complesso SO<sub>3</sub>-Piridina solubilizzato in 40 ml di DMSO. La soluzione viene portata a 4°C e lasciata in agitazione per 1 ora. Successivamente si aggiungono 200 ml di acqua e la soluzione finale viene portata a pH tra 8.5 e 9.5 con sodio idrossido 1 M. La soluzione viene, quindi, precipitata con etanolo assoluto pari ad un volume di 850 ml. Il precipitato è poi dializzato per eliminare i sali residui. Il prodotto ottenuto viene solubilizzato in acqua e percolato su resina solfonica in forma tetrabutyl ammonio, per riformare il sale iniziale. Si ottengono 12,7 grammi di acido ialuronico solfatato di grado 3, in forma di sale di tetrabutyl ammonio.

7,9 gr del sale di tetrabutyl ammonio di acido ialuronico solfatato preparato come sopra descritto, con un peso molecolare di 180000 Da. (5 meq) vengono solubilizzati in 248 ml di dimetilsolfossido (DMSO) a temperatura ambiente. A questa soluzione si aggiungono



0,7 gr di HHMP bromuro (2,5 meq) e la soluzione viene mantenuta a 37°C per 36 ore. Viene quindi aggiunta una soluzione al 2,5% (p/p) di NaCl in acqua, e la miscela risultante viene versata in 750 ml di acetone sotto agitazione. Si forma un precipitato che viene filtrato e lavato tre volte in 100 ml di acetone/acqua 5:1, tre volte con 100 ml di acetone e infine seccato sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono così 4 gr del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa del contenuto di HHMP viene condotta mediante HPLC previa idrolisi alcalina. Il contenuto totale di gruppi esterei viene condotto in accordo con il metodo di saponificazione descritto alle pagg. 169-172 di "Quantitative organic analysis via functional group" quarta edizione John Wiley and Sons Publication.

#### Esempio 7

*Preparazione di un derivato di acido ialuronico avente il 25% delle funzioni carbossiliche esterificate con il 2-idrossi-4-(2-idrossietossi)-2-metilpropiofenone (HHMP), il 10% delle funzioni carbossiliche impegnate nella formazione di legami esterei interni ed il 65% delle rimanenti funzioni salificate con sodio.*

6,21 gr del sale di tetrabutyl ammonio di acido ialuronico con un peso molecolare di 180000 Da (10 meq) vengono solubilizzati in 248 ml di DMSO a temperatura ambiente. A questa soluzione si aggiungono gr 0,72 di HHMP bromuro (2.5 meq) e la soluzione viene mantenuta a 37°C per 24 ore. Sono successivamente aggiunti 0,404 gr di trietil ammina (4 meq) e la soluzione agitata per 30 minuti. Viene quindi aggiunta una soluzione di 1,022 gr (4Meq) di 2-cloro-1-metil-piridinio





ioduro in 100 ml di DMSO e la miscela mantenuta per 15 ore a 30°C. E' poi aggiunta una soluzione al 25% (p/p) di NaCl in acqua, e la miscela risultante viene versata in 750 ml di acetone sotto agitazione. Si forma un precipitato che viene filtrato e lavato tre volte in 100 ml di acetone/acqua 5:1, tre volte con 100 ml di acetone e infine seccato sotto alto vuoto per 24 ore a 30°C. Si ottengono 4,6 grammi del prodotto desiderato. La determinazione quantitativa del contenuto di HHMP e alcool benzilico viene condotta mediante HPLC previa idrolisi alcalina. Il contenuto totale di gruppi esterei viene condotto in accordo con il metodo di saponificazione descritto alle pagg. 169-172 di "Quantitative organic analysis via functional group" quarta edizione John Wiley and Sons Publication.

#### Esempio 8

*Valutazione dell'effetto delle radiazioni ultraviolette (UV) sul cariotipo di fibroblasti umani irradiati.*

Tre campioni di fibroblasti umani ( $2 \times 10^6$ ) vengono irradiati con luce UV per tre tempi di esposizione diversi: 3-15-30 minuti.

Dopo l'irraggiamento, ogni campione cellulare è diviso in due aliquote che vengono così trattate:

- la prima è analizzata subito per la determinazione del cariotipo;
- la seconda viene riseminata in piastre da coltura contenenti il 10% di siero fetale bovino (FCS) in medium di coltura DMEM.

Questo secondo campione di cellule viene lasciato proliferare per tre cicli cellulari al termine dei quali i suddetti fibroblasti sono preparati per la determinazione del cariotipo.







L'analisi delle cellule analizzate subito dopo l'irradiazione e l'analisi dei fibroblasti lasciati per tre cicli vitali *in vitro*, ha evidenziato come non siano avvenute alterazioni all'interno dei cromosomi per nessun tempo d'esposizione alle radiazioni UV.

#### Esempio 9

*Coltura di fibroblasti umani contenuti in idrogel di acido ialuronico polimerizzato con luce UV.*

$2 \times 10^6$  fibroblasti vengono staccati dalla piastra di coltura, centrifugati a 1500 rpm per 5 minuti e risospesi in 3 ml di terreno DMEM contenente il 10% di siero fetale di bovino. Le suddette cellule sono poi aggiunte (e quindi leggermente mescolate) a 3 ml di HYBA 120 con concentrazione 100 mg/ml, per ottenere una soluzione finale di 6 ml totali contenente  $2 \times 10^6$  di cellule. Questa soluzione viene riseminata in pozzetti da coltura, subito irradiata con luce UV per un tempo d'esposizione pari a 12 minuti e quindi posta in incubatore a 37°C. Dopo 24 ore, le cellule vengono sottoposte al test di vitalità cellulare MTT: sale di tetrazolio sottoposto a reazione di ossidoriduzione solo dagli enzimi mitocondriali di fibroblasti vitali (Dezinot F. et al., J Immunol Methods, 1986, 22(89): 271-277).

Le Figure 1A e 1B evidenziano le cellule vitali colorate (ingrandite rispettivamente 10 e 32 volte) all'interno dell'idrogel dopo 24 ore di coltura.

Essendo l'invenzione così descritta, è chiaro che questi metodi possono essere modificati in vari modi. Tali modificazioni non sono da considerarsi come divergenze dallo spirito e dalle prospettive

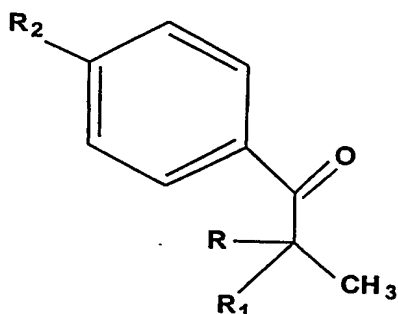


*[Handwritten signature]*

dell'invenzione e tutte le modifiche che apparirebbero evidenti ad un esperto nel campo sono comprese nell'ambito delle seguenti rivendicazioni.

# RIVENDICAZIONI

- 1) Polisaccaridi costituiti da molecole di acido ialuronico e/o suoi derivati esterificati con un fotoiniziatore rappresentato da un derivato del propiofenone, per la preparazione di esteri privi di insaturazioni del tipo c=c.



dove :

$R, R_1 = OH, CH_3, C_2H_5, CH_3-(CH_2)_n-OH$

$R_2 = OH, CH_3O, CH_3-CH_2O, HO-(CH_2)_n-CH_2O$

- 2) Polisaccaridi secondo la rivendicazione 1, capaci di reticolare quando irradiati con luce avente lunghezza d'onda da 280 a 750 nm.
- 3) Polisaccaridi secondo la rivendicazione 2, capaci di reticolare quando irradiati con luce avente lunghezza d'onda di 336 nm.



- 



- l'irradiazione dello *HYBA 120* con luce preferibilmente ultravioletta.

- 11) Processo per la preparazione di idrogel biocompatibili a partire da molecole di acido ialuronico e/o suoi derivati di cui alla rivendicazione 10, in cui il derivato del propiofenone è il 2-idrossi-4-(2-idrossietossi)-2-metilpropiofenone.
- 12) Idrogel costituiti da un estere di cui alle rivendicazioni 1-9 in forma di biomateriali per uso biomedico, sanitario, chirurgico.
- 13) Idrogel costituiti da un estere di cui alle rivendicazioni 1-9 per la preparazione di sistemi di rilascio controllato di principi attivi quali proteine, fattori di crescita, enzimi, anticorpi, farmaci ed altre sostanze biologicamente attive, per uso topico, sottocutaneo, intramuscolare, intra-articolare ed intra-midollare.
- 14) Idrogel costituiti da un estere di cui alle rivendicazioni 1-9 come supporti per la crescita di cellule sia umane che animali, differenziate e/o indifferenziate.
- 15) Idrogel costituiti da un estere di cui alle rivendicazioni 1-9 per la preparazione di tessuti connettivali ingegnerizzati.
- 16) Idrogel costituiti da un estere di cui alle rivendicazioni 1-9 per la preparazione di cartilagine ingegnerizzata reticolata direttamente nel sito d'impianto per via artroscopica.
- 17) Idrogel costituiti da un estere di cui alle rivendicazioni 1-9 per la preparazione di sostituti viscoelastici del nucleo polposo del disco intervertebrale.





- 18) Idrogel costituiti da un estere di cui alle rivendicazioni 1-9 per la preparazione di viscointegratori dell'umor vitreo.
- 19) Idrogel costituiti da un estere di cui alle rivendicazioni 1-9 per il rivestimento di dispositivi sanitari e chirurgici attraverso la tecnica del plasma coating.
- 20) Idrogel di cui alla rivendicazione 19, in cui i dispositivi sono cateteri, tubicini, valvole cardiache, stent vascolari, protesi di tessuto molle, protesi di origine animale quali valvole cardiache porcine, tendini e organi artificiali, lenti a contatto e lenti intraoculari, ossigenatori di sangue, sacche per sangue, strumenti chirurgici, sistemi di filtrazione e strumenti di laboratorio.
- 21) Medicamenti comprendenti:
  - a) una sostanza farmacologicamente e/o biologicamente attiva o un'associazione di sostanze farmacologicamente e/o biologicamente attive, e
  - b) un idrogel costituito da acido ialuronico e/o da un suo derivato preparato secondo una delle precedenti rivendicazioni.
- 22) Medicamenti secondo la rivendicazione 17 per uso topico, sottocutaneo, intramuscolare, intraarticolare ed intramidollare.
- 23) Uso di idrogel di cui alle rivendicazioni precedenti in campo biomedico, sanitario, chirurgico e come sistemi di rilascio controllato di farmaci.



PD2002A000062



- 24) Uso di idrogel di cui alla rivendicazione 23 nella prevenzione delle adesioni chirurgiche.



PD 2002 A000064

Fig. 1A

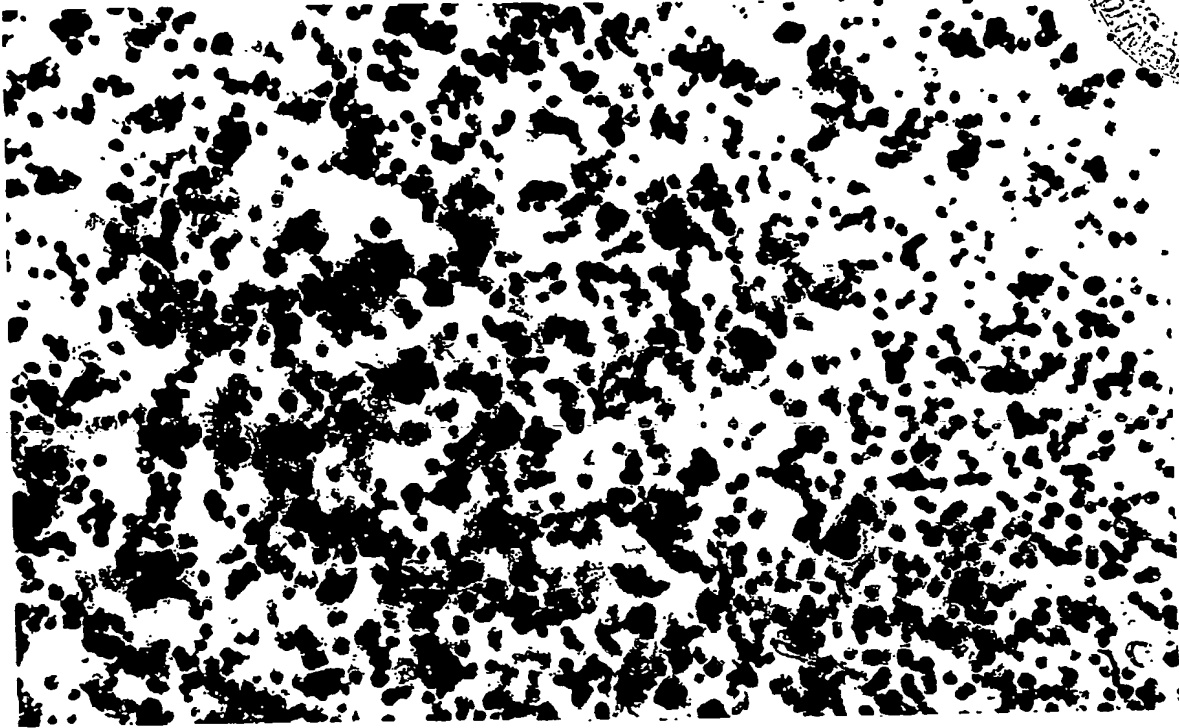
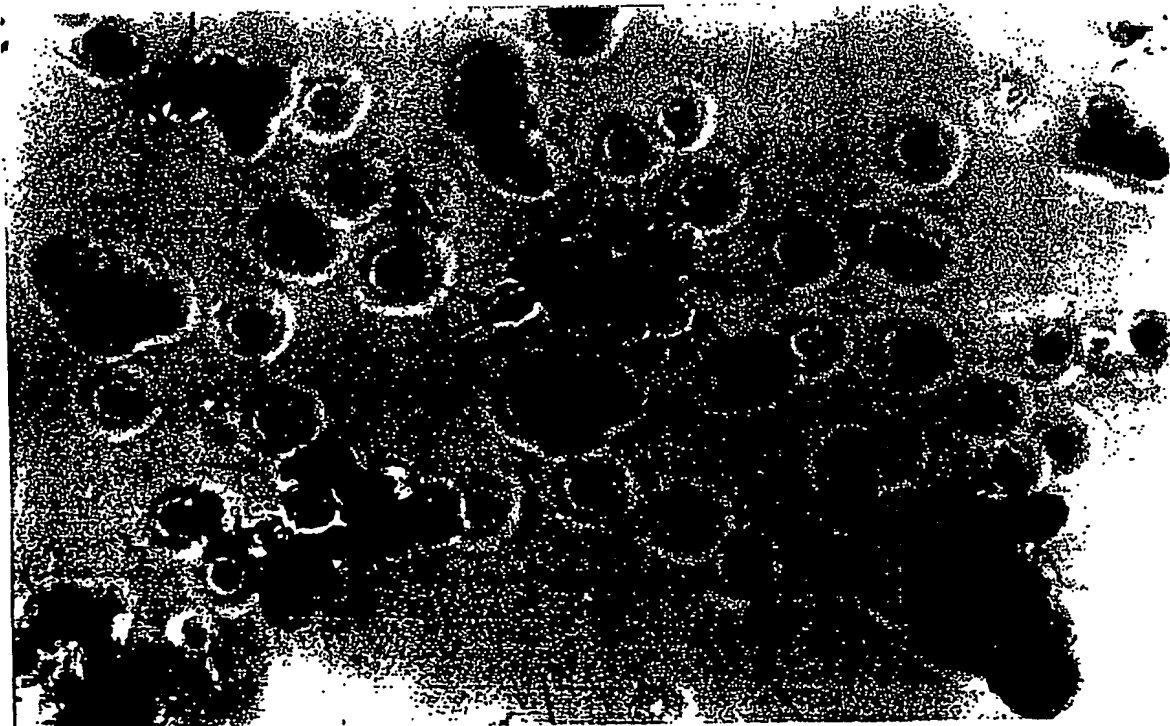


Fig. 1B



BEST AVAILABLE COPY



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**